完全。

实时荧光定量 PCR 检测有较高的灵敏度和特异性^[8],是目前检测 HBV-DNA 最常采用的方法^[9-10]。除了适宜的检测方法,恰当的 DNA 提取方法也是对体内病毒进行准确定量的关键因素。应用沉淀煮沸法提取 DNA 时因操作步骤较多,所以影响因素也较多,只有把握好每一步的操作原则,消除各影响因素,才能得到准确的检测结果。

参考文献

[1] 张韶斌,陈斯亮,罗莞超,等. 200 例 HBeAg 阳性血清样本的 HBV-DNA 分析[J]. 广东医学院学报,2008,26(4):447-448.

[2] Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment [J]. J Viral Hepat, 2003, 10(4): 324.

[3] 周丹. 乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 检测在临床诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2271-2272.

[4] 李成德,黄晓佳,陈雄毅. 不同核酸提取方法在 HBV-DNA 荧光定量检测中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1361-

1363.

[5] 陈晓东,陶志华. 核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(2): 212-214.

[6] 郭龙华,董长垣,高婧,等. 一种从血清标本中快速提取 HBV DNA 方法的建立[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(3): 332-335.

[7] 王家银. 沉淀煮沸提取方法对血清 HBV DNA 荧光定量检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1165.

[8] Jordi R, Rodriguez F, Buti M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay[J]. J Viral Hepat, 2001, 8(3): 465-471.

[9] 程钢,何蕴韶,周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(2): 135-138.

[10] Ho SK, Yam WC, Leung et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(2): 397.

(收稿日期:2011-10-04)

• 检验技术与方法 •

高危人乳头瘤病毒检测在实时多重荧光核酸扩增技术中的意义

杜娟,李晓强[△],刘跃

(湖北医药学院附属太和医院检验部,湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨实时多重荧光聚合酶链反应(PCR)检测宫颈脱落细胞内高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染的临床意义,建立快速、准确、适于推广的检测方法。**方法** 采用实时多重荧光 PCR 技术检测 1 560 例宫颈脱落细胞高危型 HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)感染状况。**结果** 1 560 例患者高危型 HPV 阳性率为 21%(327/1 560)。其中宫颈炎、湿疣、LSIL、HSIL、鳞状细胞癌患者的高危型 HPV 阳性率分别为 10.3%、28.4%、21.6%、35.2%和 88.9%。**结论** 实时多重荧光 PCR 技术检测宫颈脱落细胞内高危型 HPV 感染,具有快速、简便、灵敏、不易污染等优点,适用于大规模筛查和高危型 HPV 持续感染监测。

关键词:人乳头瘤病毒; 聚合酶链反应; 宫颈脱落细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0460-02

人乳头瘤病毒(HPV)是一种双链小 DNA 病毒(约 8kb),目前已鉴定出 100 余种亚型,其中感染生殖道的亚型有近 30 种,依其致病性不同分为高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等)和低危型(HPV6、11、42、44 等)两大类^[1]。高危型 HPV 持续感染与宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌发病密切相关,检测高危型 HPV 对宫颈癌的筛查和预防具有十分重要的意义^[2-3]。我们采用实时多重荧光聚合酶链反应(PCR),检测宫颈脱落细胞高危型 HPV 感染,以便建立一种快速、准确、适于推广的高危型 HPV 检测方法,为临床提供一种有效的辅助诊断依据,实现宫颈癌的早期筛查、及时治疗,提高治愈率。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 该我院妇科门诊患者共 1 560 例,年龄 17~69 岁。

1.1.2 仪器与试剂 罗氏 Lightcycle 实时荧光 PCR 仪(瑞

士), HPV 荧光 PCR 检测试剂盒由港龙生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞标本收集 检查前 3 天不做阴道冲洗,不使用阴道内药物,24 h 内禁止性行为,并在非经期检查。检查时无菌棉拭子置于宫颈口处逆时针转 3 圈,停留 10 秒,取得脱落细胞,放入含 1 mL 无菌生理盐水的样品管中,充分漂洗后,棉拭子贴壁挤干丢弃。13 000r/min 离心 10 min,弃去上清液,保留管底沉淀提取 DNA。

1.2.2 DNA 提取 在标本沉淀物中加入 DNA 提取液 50 μL,振荡混匀,100 °C 加热 10 min,13 000 rpm 离心 10 min,取上清液用于 PCR 检测。

1.2.3 PCR 扩增 每次实验必须设阴性、临界阳性及强阳性对照,处理方法同标本。PCR 反应体系为 25 μL,其中待检上清液 2 μL。按以下条件扩增:50 °C 2 min;94 °C 10 min;93 °C 10 s,52 °C 30 s,62 °C 40 s,共做 45 个循环;最后 40 °C 1 min。

[△] 通讯作者, E-mail: bluewhale27@hotmail.com.

根据设置的基线和阈值,仪器自动显示检测的 Cr 值,出现扩增曲线、Cr 值小于 37 的检测结果判断为阳性,否则为阴性。此试剂可一次检测 13 种高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68) 的感染。

1.2.4 病理检查 所有患者经阴道镜下行宫颈活组织检查,以病理结果作为最终诊断结果。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验方法,应用 SPSS13.0 软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 病理活检结果 1 560 例患者宫颈活组织病理检查结果如下:宫颈炎 711 例,湿疣 264 例,低度鳞状上皮内皮病变 (LSIL) 232 例,高度鳞状 (HSIL) 344 例,鳞状细胞癌 9 例。

2.2 实时多重荧光 PCR 结果 上述 1 560 例患者中,高危型 HPV 阳性率为 21% (327/1560)。按宫颈炎、湿疣、LSIL、HSIL、鳞状细胞癌顺序,高危型 HPV 阳性率分别为 10.3%、28.4%、21.6%、35.2% 和 88.9%,见表 1。HSIL、鳞状细胞癌中高危型 HPV 感染率明显高于宫颈炎、湿疣和 LSIL ($P < 0.05$)。

表 1 实时多重荧光 PCR 检测高危型 HPV 结果

病理诊断	n	阳性(n)	阳性率(%)
宫颈炎	711	73	10.3
湿疣	264	75	28.4
LSIL	232	50	21.6
HSIL	344	121	35.2
鳞状细胞癌	9	8	88.9

3 讨 论

HPV 是迄今已明确的人类 DNA 肿瘤病毒之一,宫颈高危型 HPV 持续感染与宫颈上皮内中高度瘤样变 (CIN II ~ III) 和 HSIL 密切相关^[4-5],是宫颈癌产生的致病因素^[6]。2001 年“欧洲生殖道感染和肿瘤研究组织 (EUROGIN) 子宫颈癌全球防御大会”一致认为:HPV DNA 检测是宫颈上皮内瘤变及宫颈癌筛查的最佳方法;2003 年美国 FDA 将 HPV DNA 检测列为妇女常规检测项目。

本研究所用实时多重荧光 PCR 检测试剂的基本原理为基于多重 PCR 和荧光 PCR 技术的核酸扩增方法,经过 40 次扩增后,信号可放大数百万倍,可检测低至 1 个拷贝的目的基因,因而具有更高的检测灵敏度。在本研究的大样本检测中,实时多重荧光 PCR 检测的高危型 HPV 的阳性率为 21%,略低于文献报道的 HC2 法阳性率^[7],其原因可能为在宫颈脱落细胞标本中含有大量的 DNA 聚合酶抑制剂(如血红蛋白、宫颈黏液等),从而降低了聚合酶的扩增效率。此外,反应体系内多对引物间的比例也会影响到扩增的灵敏度。但是在检测的特异度方面,多重荧光 PCR 高于 HC2 法^[8]。

宫颈癌的发生与高危型 HPV 的持续感染及高病毒载量密切相关^[9]。与宫颈癌的发病率相比,高危型 HPV 的感染率高得多^[10],其中大部分妇女为高危型 HPV 的短暂性感染,通常在 8~10 个月左右自行消除,仅有少数妇女持续感染乃至发

展成为宫颈癌^[11]。本研究结果显示,HSIL、鳞状细胞癌患者中高危型 HPV 感染率明显高于宫颈炎、湿疣和 LSIL 等良性疾病患者。可见,高危型 HPV 的定期筛查是确定有否高危型 HPV 持续感染的必要手段,对识别和监测 HPV 感染的高危人群、预防宫颈癌的发生、治疗癌前病变以及复发监测具有重要的临床意义。本研究所用实时多重荧光 PCR 检测试剂对 13 种高危型 HPV (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68) 的检测是在同一反应管中完成,操作简便,省时省力,扩增后无需开盖检测,不易污染。所用样本为宫颈脱落细胞,取样方便,无痛苦,患者易于接受,是一种较好的无创检查方法。

综上所述,实时多重荧光 PCR 技术具有简便、快速、不易被污染、取样方便等优势,适合大批量标本检测和高危人群普查,可作为 HPV 定期筛查的推荐方法,对预警癌变倾向,及时发现、预防和指导治疗早期癌变有重要价值。

参考文献

- [1] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer, a worldwide perspective international biological study on cervical cancer (BSCC) study group[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(11):796-802.
- [2] Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high risk province of Costa Rica[J]. JAMA, 2000, 283(1):87-89.
- [3] Petry KU, Menton S, Menton M, et al. Inclusion if HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients[J]. Br J Cancer, 2003, 88(10):1570-1577.
- [4] Krzysztow J, Joanna L, Janusz E, et al. Human papilloma virus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR [J]. J Clin Microbio, 2003, 41(5):608-612.
- [5] Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, et al. Persistent Human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2008, 168(2):123-137.
- [6] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology[J]. Gynecol Oncol, 2007, 107(2 suppl 1):2-5.
- [7] 方红辉,唐曙明,薄宁,等.两种方法用于高危型 HPV 检测的结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(11):1552-1553.
- [8] Jianmin YU, Shen ZJ. The comparison of efficiency between hybrid capture 2 and multi-fluorescent polymerase chain reaction in the detection of the high-risk Human papillomavirus types[J]. Laboratory Medicine, 2008, 5(2):135-137.
- [9] 洪蝶,陈怀增.人乳头瘤病毒基因型检测方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1):58-64.
- [10] 赵奕.人乳头瘤病毒基因与宫颈癌关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(6):516-520.
- [11] 赵方辉,马俊飞,乔友林,等.人乳头状瘤病毒 DNA 载量与宫颈病变的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(11):921-924.

(收稿日期:2011-08-09)